



TITLE:

Eph/ephrinシグナルによるRhoファミリーGタンパク質の活性制御メカニズムとその機能の解析(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

竹内, 真吾

CITATION:

竹内, 真吾. Eph/ephrinシグナルによるRhoファミリーGタンパク質の活性制御メカニズムとその機能の解析. 京都大学, 2015, 博士(生命科学)

ISSUE DATE:

2015-07-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19249>

RIGHT:

京都大学	博士（生命科学）	氏名	竹内 真吾
論文題目	Eph/ephrinシグナルによるRhoファミリーGタンパク質の活性制御メカニズムとその機能の解析		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>Eph受容体は一回膜貫通型のチロシンキナーゼ受容体であり、そのリガンドephrinとEph受容体は細胞間接着依存的に結合すると、Eph受容体側（フォワードシグナル）とephrin側（リバースシグナル）の両方向にシグナルを流す。Eph/ephrinシグナルはこの両方向へのシグナルによってそれぞれの細胞の形態を制御し、脳や血管など様々な組織の形成に働いている。このEph/ephrinシグナルの下流で働き、細胞の形態制御に関与する分子としてRhoファミリー低分子量Gタンパク質がある。Rhoファミリー低分子量Gタンパク質は主にアクチン細胞骨格を制御することで細胞運動や神経突起伸長など様々な細胞形態を制御している。近年、Eph/ephrinフォワードシグナルの下流でRhoファミリーGタンパク質の活性制御因子が神経回路形成に働いていることが明らかになっている。またEph/ephrinリバースシグナルにおいてRac1の活性化因子が神経突起の伸長に関わっていることが明らかになっているが、様々な組織や細胞においてEph/ephrinシグナルがどのようにRhoファミリー低分子量Gタンパク質の活性を制御しているのか、およびその生理的な機能については未だ不明な点が多い。</p> <p>申請者は、Eph/ephrinシグナルによるRhoファミリー低分子量Gタンパク質の活性制御機構とその機能について解析を行い、まずEph/ephrinフォワードシグナルによる細胞運動制御におけるβ2-chimaerinの役割について解析した。β2-chimaerinはその相同性の高さからα2-chimaerinと同様にEph受容体の下流で働いている可能性が考えられた。免疫沈降実験によりβ2-chimaerinはEph受容体と結合することがわかった。またβ2-chimaerinはEph/ephrinフォワードシグナルによってRac1を不活性化することがわかった。そこでEph/ephrinフォワードシグナルにおけるβ2-chimaerinの機能について調べるために、HeLa細胞を用いて、細胞運動アッセイを行った。HeLa細胞では、ephrinA1刺激によって細胞運動が抑制されるが、β2-chimaerinをRNAiにより、ノックダウンすると、ephrinA1による細胞運動の抑制が解除された。これらの結果から、β2-chimaerinはEph/ephrinフォワードシグナルの下流でRac1を不活性化することで細胞運動の抑制に働いていることが示唆される。</p> <p>次に、Eph/ephrinリバースシグナルによる軸索制御におけるRhoAの役割について解析した。ephrinBクラスを認識する抗体を用いて培養した海馬神経細胞におけるephrinB1の局在を調べたところ、細胞体や樹状突起だけでなく、軸索にもその局在が見られた。そこで海馬神経細胞の軸索におけるEph/ephrinリバースシグナルの機能を調べるために、EphB2の細胞外ドメインで海馬神経細胞を刺激すると軸索の退縮が見られ、軸索の長さや分枝が減少していた。RhoAは軸索の伸長阻害や退縮に働いていることが知られているので、Eph/ephrinリバースシグナルによる軸索の退縮にRhoAが関与しているか阻害剤を用いて検討した。RhoAおよびその下流のROCKの阻害剤をあらかじめ処理しておく、EphB2刺激による軸索の長さや分枝の減少が抑制された。またEphB2刺激によりROCKの基質であるMLC2のリン酸化が亢進していた。これらの結果から、海馬神経細胞においてEph/ephrinリバースシグナルはRhoA/ROCK経路を介して軸索の退縮を引き起こすことが明らかになった。</p> <p>以上のことから本研究において申請者は、Eph/ephrinフォワードシグナルおよびリバースシグナルによる細胞形態の制御においてRhoファミリーGタンパク質の活性制御とその役割の一端を明らかにした。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

エフリンは、発生過程における細胞の位置や数を制御する重要な因子である一方、このシグナルの異常が様々な疾患の発症と深く関わっていることも多数報告されている。**Eph**受容体は一回膜貫通型のチロシンキナーゼ受容体であり、そのリガンド**ephrin**と**Eph**受容体は細胞間接着依存的に結合すると、**Eph**受容体側(フォワードシグナル)と**ephrin**側(リバースシグナル)の両方向にシグナルを流す。これら両方向のシグナルが流れることによって、様々な細胞における形態変化や運動性の制御が引き起こされることがわかっているものの、その分子メカニズムについては不明な点が多いのが現状であった。本論文では、まず低分子量Gタンパク質**Rac**を特異的に不活性化する**GAP**として知られている**β2-chimaerin**が、**EphA**受容体に結合することを見出した。また、**ephrinA1**による**EphA**受容体の活性化によって引き起こされるフォワードシグナルを**β2-chimaerin**が媒介し、**Rac1**を不活性化することで細胞の運動性を負に制御することも明らかにした。その分子メカニズムの一端として、**EphA**受容体が**β2-chimaerin**に結合すると**β2-chimaerin**と**Rac1**との結合が促進されることを見出し、このことが**EphA**受容体による**Rac1**の不活性化につながる可能性を示唆している。このように、**EphA**受容体によるフォワードシグナルとして**Rac**の不活性化を引き起こし、その分子メカニズムの一端を初めて明らかにしたことは、**EphA**受容体による反発性シグナルを解明する研究につながるもので高く評価できる。

一方、本論文ではリガンドである**ephrin**によって引き起こされるリバースシグナルにも着目し、今度は海馬神経細胞を用いて**Eph/ephrin**リバースシグナルの軸索制御における機能とその分子メカニズムの解析を行った。その結果、**ephrinB**の局在が海馬神経細胞の軸索において確認され、その受容体として知られている**EphB2**の細胞外ドメインを用いて**ephrinB**のリバースシグナルを引き起こすことで、海馬神経細胞において軸索の退縮が見られた。また軸索の形態について詳しく調べたところ、**EphB2**の細胞外ドメインを加えることで軸索の長さや分枝が有意に減少していることが明らかになった。さらには、その分子メカニズムの一端として、**RhoA-ROCK**経路の関与が示唆された。このように、海馬神経細胞の軸索形成過程における**Eph/ephrin**リバースシグナルの機能、さらにはその分子メカニズムの解明までつなげたことは、神経組織の発生及び**Eph/ephrin**リバースシグナルの機能を理解する上で意義のある成果であると考えられる。

本論文は、リガンド**ephrin**と**Eph**受容体によるフォワードシグナルとリバースシグナルの違いとその制御メカニズムについて論理的かつ一貫性をもって示したものであり、エフリンシグナルの役割とその普遍的な分子機構の解明に寄与する新しい発見である。これらの理由により、本論文は生命科学の理解・発展に貢献する重要な論文であるとみなし、博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。

平成27年5月1日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 年 月 日